

**METHOD FOR MEASURING MATERIAL HAVING SPECIFIC SUGAR CHAIN****Publication number:** JP3073852**Publication date:** 1991-03-28**Inventor:** ISHIKAWA EIJI; KATSUMARU HIROYUKI**Applicant:** ISHIKAWA EIJI; SUMITOMO PHARMA**Classification:****- international:** **G01N33/53; G01N33/574; G01N33/68; G01N33/92;  
G01N33/53; G01N33/574; G01N33/68; G01N33/92;**  
(IPC1-7): G01N33/53; G01N33/574**- european:** G01N33/574M; G01N33/68; G01N33/92**Application number:** JP19900132085 19900522**Priority number(s):** JP19890132285 19890524**Also published as:**

EP0399464 (A2)

EP0399464 (A3)

**Report a data error here****Abstract of JP3073852**

**PURPOSE:** To make specific and rapid determination with a high sensitivity by executing a stage of conjugating a functional group-conjugated antibody to a carrier and a stage for forming saccharides-lectin conjugation. **CONSTITUTION:** The functional group-conjugated antibody which recognizes a material having specific sugar chain is added to a specimen liquid contg. the above-mentioned sugar chain and thereafter, a complex contg. this material and antibody is conjugated via the functional group to the carrier. The complex contg. the above-mentioned material and antibody is selectively dissociated from the carrier. The lectin which recognizes the specific sugar chain of the above-mentioned material is conjugated with the above-mentioned complex contg. the material and antibody. The quantity of the conjugate of the complex contg. the above-mentioned material and antibody and the lectin is measured. The in-vivo trace material having the sugar chain is measured in this way, by which the specific and rapid determination method of the high sensitivity not possible with the conventional method is obtained.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平3-73852

⑬ Int. Cl.<sup>5</sup>

G 01 N 33/53  
33/574

識別記号

S  
B

庁内整理番号

7906-2G  
9015-2G

⑭ 公開 平成3年(1991)3月28日

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全14頁)

⑮ 発明の名称 特異的糖鎖を有する物質の測定法

⑯ 特 願 平2-132085

⑰ 出 願 平2(1990)5月22日

優先権主張 ⑱ 平1(1989)5月24日 ⑲ 日本(JP) ⑳ 特願 平1-132285

㉑ 発 明 者 石 川 栄 治 宮崎県宮崎市大塚台西3丁目24番1

㉒ 発 明 者 勝 丸 浩 之 大阪府大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住友製薬株式会社内

㉓ 出 願 人 石 川 栄 治 宮崎県宮崎市大塚台西3丁目24番1

㉔ 出 願 人 住友製薬株式会社 大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号

㉕ 代 理 人 弁理士 細田 芳徳 外1名

明 細 書

1. 発明の名称

特異的糖鎖を有する物質の測定法

2. 特許請求の範囲

(1) 下記の(A)、(B)、(C)及び(D)工程を包含することを特徴とする特異的糖鎖を有する物質の定量方法。

工程(A):特異的糖鎖を有する物質を含む被検液に該物質を認識する官能基結合抗体を加えた後、該物質と該抗体を含む複合体を該官能基を介して、担体に結合させる工程。

工程(B):該物質と該抗体を含む複合体を選択的に担体より解離させる工程。

工程(C):該物質の特異的糖鎖を認識するレクチンを該物質と該抗体を含む複合体に結合させる工程。

工程(D):該物質と該抗体を含む複合体とレクチンとの結合体の量を測定する工程。

(2) 請求項(1)記載の工程(D)が標識されたレク

チン、該物質に対する標識抗体または標識されたレクチン抗体の量を測定するものである請求項(1)記載の定量方法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は特異的糖鎖を有する物質の定量方法に関する。

〔従来の技術〕

ホルモンや抗体等の蛋白質の定量は診断学上非常に重要であるが、これら蛋白質の多くは糖鎖を含有する糖蛋白質である。近年、糖鎖の分析技術が進歩した結果、これら糖蛋白質においては蛋白質部分が同一であっても、糖鎖の構造の異なる糖蛋白質が存在することが明らかになった。しかも、特定の疾患では、特異的糖鎖を有する糖蛋白質のみが増加することが判明した。例えば、肝細胞癌患者の血清でレンズマメレクチン(LCA)反応性の糖鎖を有するアルファフェトプロテイン(AFP)が増加するが、ヨークサック腫瘍では、LCA弱反応性AFPが出現する。また $\alpha_1$ -酸性糖

蛋白、アルカリフォスファターゼ (ALP)、絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG) で同様の現象が知られている〔武田和久、臨床病理、臨時増刊第 79号、第 139 頁 (1988年)〕。癌、肝炎等の診断において、糖鎖の特異性を認識できる検出定量法が待望される所以である。

現在、上記のような微量糖蛋白質は特異抗体を用いるイムノアッセイにより定量されている。しかし、糖蛋白質の糖鎖の違いまで識別できる抗体が無く、蛋白部分を認識する抗体が用いられているため、目的とする特異的糖鎖を有する蛋白質の検出定量法としては特異性に欠けるものである。

一方、糖鎖を特異的に認識する物質として、以前よりレクチンが知られている。特異的糖鎖構造をレクチンで識別して病気特に腫瘍の鑑別利用する試みとしては、例えば「スカンジナビアン・ジャーナル・オブ・イムノロジー、14巻、15頁、1981年」、「SRL宝函、12巻、3号、30頁、1988年」において血清中に出現するアルファフェト蛋白の糖鎖構造を識別することにより原発

性肝癌とヨークサック腫瘍との鑑別を行なっている。前者では、方法として、レクチン吸着交叉免疫電気泳動法が、後者ではレクチン結合セファロースによるアフィニティークロマトグラフ法が使用されている。しかしながら、両法とも操作が煩雑であり、誰でも臨床の場で診断に用いるような簡便、迅速な測定法ではない。

この点を考慮して、最近、操作の簡単なレクチンと抗体を用いたサンドイッチ型アッセイ法も発表されている。つまり、①：抗体の結合した固相と検体とを反応させ、目的とする糖蛋白質をトラップする、②：標識レクチンを加えてサンドイッチ状の複合体を形成させる、③：酵素標識された複合体の測定を行なう、方法である〔木下他、クリニカ・キミカ・アクタ (Clinica Chimica Acta)、第 179 巻、第 143 頁 (1989年)〕。

〔発明が解決しようとする課題〕

この方法は、迅速簡便な測定が可能であるが、レクチン-糖鎖結合を用いるため、蛋白質認識抗体の場合と異なる問題が、以下に述べる理由から

生じうる。すなわち、測定する特異的糖鎖を有する糖蛋白質の糖鎖が、検体に共存する他の糖蛋白質にも多量に存在する場合が多い。例えば、糖蛋白質である AFP は、癌化した細胞が産生する AFP と正常細胞が産生する AFP とでは糖鎖の構造が異なる事が知られているが、癌化した細胞が産生する AFP の糖鎖を認識するレクチンは検体中に多量に存在する IgG の糖鎖をも認識する。その為、抗体を結合した固相と検体とに反応し目的とする糖蛋白質を結合する際、非特異的に結合した IgG に起因するバックグラウンドを生じ、このバックグラウンドが測定対象の検体毎に異なる為、測定値の信頼性が問題となる。

レクチンを結合した固相と検体を先に反応させ、その後標識抗体を加える方法は上記の問題は解決できるが、大容量の固相を必要とし、この結果標識抗体のバックグラウンドが増加するので測定値の信頼性が得られない。

上記のように、従来の特異的糖鎖を有する物質の定量法は、特異性、操作性、信頼性いずれかが

不十分であり、これらの要件をすべて満たす高感度の臨床用糖鎖測定技術は、当該技術分野において未だ確立されていない。

従って、本発明の目的は、特異的糖鎖を有する糖蛋白質を検体中の共存物質の影響を受けずに簡便かつ高感度に測定する新規な定量方法を提供することにある。

〔課題を解決するための手段〕

本発明は、下記の (A)、(B)、(C) 及び (D) 工程を包含することを特徴とする特異的糖鎖を有する物質の定量方法である。

工程 (A)：特異的糖鎖を有する物質を含む被検液に該物質を認識する官能基結合抗体を加えた後、該物質と該抗体を含む複合体を該官能基を介して、担体に結合させる工程。

工程 (B)：該物質と該抗体を含む複合体を選択的に担体より分離させる工程。

工程 (C)：該物質の特異的糖鎖を認識するレクチンを該物質と該抗体を含む複合体に結合させる工程。

工程(D):該物質と該抗体を含む複合体とレクチンとの結合体の量を測定する工程。

以下、本発明について工程順に説明する。

工程(A) について

本工程は、①:測定すべき特異的糖鎖を有する物質を含む被検液に、該物質の官能基を有する特異的抗体を加えて免疫複合体を形成させ、②:該官能基を介して担体上に結合させる工程である。

本発明の実施に当たり、有用な被検液としては例えば、血液、細胞組織液、リンパ液、胸水、腹水、羊水、胃液、尿、すい液、髄液、唾液等の各種の体液を例示できる。これらの内では血液、特に血清または血漿が好ましい。測定すべき特異的糖鎖を有する物質としては、これら体液中に含まれる糖蛋白質あるいは糖脂質等が挙げられる。

糖蛋白質の例としては、 $\gamma$ -グルタミルトランスベプチターゼ( $\gamma$ -GTP)、 $\alpha$ -フェトプロテイン(AFP)、癌胎児性抗原(CEA)、

アルカリ性ホスファターゼ(ALP)、アミラーゼ(AMY)、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(HCG)等を、糖脂質の例としては、ガングリオシドGM<sub>1</sub>、GM<sub>2</sub>、GM<sub>3</sub>、GD<sub>1a</sub>、GD<sub>2</sub>、GD<sub>3</sub>、フォルスマン抗原、グロボシド等が挙げられる。

これらの特異的糖鎖を有する物質に対する抗体の調製法はそれら自体公知であるか、または公知の方法に従うことができる。

特異的糖鎖を有する物質に対する抗体には、工程(A)での複合体と担体との結合に関与する官能基を結合させておく必要がある。ここで官能基としては、例えばジニトロフェニル基またはトリニトロフェニル基等のハプテン、ビオチン、抗体または抗原等が挙げられる。官能基の抗体への結合は自体、既知の方法によって行なえばよい。

担体は、本発明の目的を損なわない限り特に制限はなく、従来の免疫学的測定法において使用されているものを使用すればよい。例えば、

ポリスチレン、ポリアクリル、テフロン、紙、ガラス、アガロース等が挙げられる。また、その形状にも特に制限はない。担体は、工程(A)で形成された複合体を結合するための、または、担体上で複合体を形成させるための反応基を有する必要がある。

担体に結合する反応基としては官能基に対応した通常のもので挙げられる。例えば

- 1)官能基がジニトロフェニル基またはトリニトロフェニル基等のハプテンの時は、これらに対する抗体が挙げられる。
- 2)官能基がビオチンの時は、アビジンまたはストレプトアビジンが挙げられる。
- 3)官能基が抗原または抗体の時は、対応する抗体または抗原が挙げられる。

必要ならば-S-S-結合の様な、複合体を分割せしめない条件で複合体を担体より解離させることができる結合を介して結合させる。

反応基の担体への結合は、自体既知の方法で行なえば良い。

本発明において、測定すべき特異的糖鎖を有する物質と官能基を結合した抗体を含む複合体は、通常次の(a)または(b)いずれか好適な方法によって担体と結合させる。

- (a) 被検液中の測定すべき特異的糖鎖を有する物質と官能基を結合した抗体を含む複合体を形成させた後、担体に当該複合体を結合せしめる工程。
- (b) 当該複合体を担体上で形成させる工程。

前記(a)の方法における複合体の形成は、例えば、被検液に官能基を結合した抗体を加えて、通常の抗原抗体反応に用いられる条件下に行なわれる。一般には、0~45℃、1時間~数10時間、好ましくは、20~37℃、1~6時間で複合体が形成される。この後、被検液に反応基を有する担体を加え、上記と同様の条件下、複合体を担体に結合させる。

前記(b)の方法は、被検液中に官能基を結合させた抗体および反応基を結合させた担体を同時に加えることによって行なわれる。反応条件等

は(a)の方法に準じ、一般には0～45℃、1時間～数10時間、好ましくは、20～37℃、1～6時間で当該複合体が形成される。

担体に前記複合体を結合させた後、一般には担体を洗浄する。通常の免疫学的測定に用いられる条件が採用される。

#### 工程(B)について

本工程は、担体に結合した特異的糖鎖を有する物質および該物質の特異的抗体等を含む複合体を、選択的に担体から解離させる工程である。担体から選択的に前記複合体を解離させる方法としては、該複合体の免疫学的結合を壊さずに行なえる操作が好ましい。一般には、複合体と担体との結合に用いた官能基と同一の反応部位を有する物質を被検液に充分量加えて行なう。例えば、官能基がジニトロフェニル基の時はジニトロフェニルアミノ酸(ジニトロフェニルリジン等)、官能基がビオチンの時はビオチン等を添加する。また、-S-S-結合を介して結合させた場合は、還元剤(2-メルカプトエタ

ノール等)を加えればよい。

#### 工程(C)について

本工程は、測定すべき特異的糖鎖を有する物質とその特異的糖鎖を認識するレクチンとを反応させ、糖鎖-レクチン結合を形成させる工程である。

レクチンとしては、従来より知られていた動物由来、植物由来レクチンより、任意のものを選ぶことができるが、レクチンの例としてはCon A(タチナタマメレクチン)、RCA120(ヒマレクチン:ヒマアグルチニン)、RCA60(ヒマレクチン:リシン)、LCA(レンズマメレクチン)、PSA(エンドウマメレクチン)、VFA(ソラマメレクチン)、LEPHA(インゲンマメレクチン)、E-PHA(インゲンマメレクチン)、WGA(小麦胚レクチン)、PNA(ピーナッツレクチン)、アガラクト蛋白質結合レクチン(ニワトリ由来)、アシアロ蛋白質結合レクチン(哺乳類由来)、ザルコレクチン(センチニクバエ由来)、AA

L(Aleuria aurantia)、DSA(Datura Stramonium)等が挙げられる。これらレクチンが認識する糖鎖構造はそれぞれ異なっており、測定対象および目的によって、適宜選択する事ができる。

レクチンは、①:そのまま被検液に添加する、②:工程(A)の担体とは別の担体(他の担体)に公知の蛋白質固定方法により、固定して用いる、③:工程(D)で用いる標識物質を結合させておく、④:官能基を結合させておき、反応基を結合させた他の担体や、反応基を結合させた標識との結合に利用するなど多様な形態で用いる。

また、工程(C)は工程(A)および(B)の前後、または同時に行なう事ができ、いずれかは測定条件により、適宜選択する。

より具体的には上記の糖鎖-レクチン結合を含む複合体は、①:レクチン固定化担体を用いて他の担体上に形成させた後、標識抗体を添加して複合体をラベルする、②:標識レクチンを、

抗体固定化担体に結合した特異的糖鎖を有する物質-抗体複合体に添加する等、の方法により、標識化され、次の工程(D)で定量される。

レクチンと特異的糖鎖を有する物質との反応は自体既知の方法にて行なわれる。

#### 工程(D)について

本工程は工程(A)、(B)および(C)で形成されたレクチン、特異的糖鎖を有する物質及び抗体を含むサンドイッチ状結合体の量を、結合体に結合させた標識により、測定する工程である。

標識としては、免疫学的測定において、測定に利用されるいずれの物質でもよく、酵素、放射性物質、蛍光物質、発光物質、金属化合物等が挙げられる。

例えば、酵素ではペルオキシダーゼ、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、放射性物質としては $^3\text{H}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{32}\text{P}$ 等、蛍光物質としてはフルオレセインイソチオシアネート、発光物質としてはアクリジウム塩等が挙げられる。金属化合物としてはユー

ロビウム等を挙げることができる。

標識を結合させる方法としては、従来、免疫学的測定法において抗体、抗原に標識を結合するいずれの結合方法でも良い。

担体上の複合体の測定は、標識に応じた自体既知の手段によって行えばよい。

以上、工程順に本発明を説明したが、前述の如く、工程(A)、(B)及び(C)で行なわれる抗原抗体複合体の形成、糖鎖-レクチン結合の形成を様々な態様で用いることにより、従来離れなかった生体試料中の特異的糖鎖を有する物質の検出、定量に、適切な測定系を組む事ができる。

以下に、代表的な応用例を略号を用いて説明する。

	略号
・ 特異的糖鎖を有する物質	: X-s
(sは特異的糖鎖)	
・ 官能基	: f
・ 反応基	: r
・ 標識	: m

を形成させる。

6. mを用いて、5. の結合体を定量する。

#### タイプII: 標識レクチン型1

1. X-sを含む被検液に [X]-f を加え、免疫複合体  $f-[X]=X-s$  を形成させる。
2. C-rを加え、 $C-r=f-[X]=X-s$  を形成させ、洗浄する。
3. L-mを加え、 $C-r=f-[X]=X-s=L-m$  を形成させ、洗浄する。
4. 過剰量の f を加え、 $f-[X]=X-s=L-m$  を解離させる。C-r=fを除く。
5. C-[[X]]を加え、 $C-[[X]]=\underset{\substack{| \\ f}}{[X]}=X-s=L-m$  を形成させ、洗浄する。
6. mを用いて、5. の結合体を定量する。

#### タイプIII: 標識レクチン型2

1. X-sを含む被検液に [X]-f を加え、免疫複合体  $f-[X]=X-s$  を形成させ

- ・ レクチン : L
- ・ Xに対する特異的抗体 : [X], [X]'
- ・ [X]に対する特異的抗体 : [[X]]
- ・ Lに対する特異的抗体 : [L]
- ・ 担体 : C
- ・ 親和性結合は=、共有結合または吸着による結合は-で示す。

#### タイプI: レクチン固相型

1. X-sを含む被検液に [X]-f を加え、免疫複合体  $f-[X]=X-s$  を形成させる。
2. C-rを加え、 $C-r=f-[X]=X-s$  を形成させ、洗浄する。
3. 過剰量の f を加え、 $f-[X]=X-s$  を解離させる。C-r=fを除く。
4. C-Lを加え、 $C-L=s-X=[X]-f$  を形成させ、洗浄する。
5. [X]'-mを加え、 $C-L=s-X=\underset{\substack{|| \\ [X]'}}{[X]}-f-m$

る。

2. C-rを加え、 $C-r=f-[X]=X-s$  を形成させ、洗浄する。
3. 過剰量の f を加え、 $f-[X]=X-s$  を解離させる。C-r=fを除く。
4. L-mを加え、 $f-[X]=X-s=L-m$  を形成させる。
5. C-[[X]]を加え、 $C-[[X]]=\underset{\substack{| \\ f}}{[X]}=X-s=L-m$  を形成させ、洗浄する。
6. mを用いて、5. の結合体を定量する。

#### タイプIV: レクチン単独添加型1

1. X-sを含む被検液に [X]-f を加え、免疫複合体  $f-[X]=X-s$  を形成させる。
2. Lを加え、 $f-[X]=X-s=L$  を形成させる。
3. C-rを加え、 $C-r=f-[X]=X-s=L$  を形成させ、洗浄する。

4. 過剰量の  $f$  を加え、 $f - [X] = X - s$   
 $= L$  を解離させる。  $C - r = f$  を除く。

5.  $C - [[X]]$  を加え、  
 $C - [[X]] = [X] = X - s = L$   
 $\quad \quad \quad \downarrow$   
 $\quad \quad \quad f$

を形成させ、洗浄する。

6.  $[L] - m$  を加え、  
 $C - [[X]] = [X] = X - s = L = [L] - m$   
 $\quad \quad \quad \downarrow$   
 $\quad \quad \quad f$

を形成させ、洗浄する。

7.  $m$  を用いて、6. の結合体を定量する。

#### タイプ V: レクチン単独添加型 2

1.  $X - s$  を含む被検液に  $[X] - f$  を加え、  
 免疫複合体  $f - [X] = X - s$  を形成させる。

2.  $C - r$  を加え、 $C - r = f - [X] = X - s$  を形成させ、洗浄する。

3.  $L$  を加え、 $C - r = f - [X] = X - s = L$  を形成させ、洗浄する。

4.  $[L] - m$  を加え、 $C - r = f - [X]$

$= X - s = L = [L] - m$  を形成させ、洗浄する。

5. 過剰量の  $f$  を加え、 $f - [X] = X - s = L = [L] - m$  を解離させる。  $C - r = f$  を除く。

6.  $C - [[X]]$  を加え、  
 $C - [[X]] = [X] = X - s = L = [L] - m$   
 $\quad \quad \quad \downarrow$   
 $\quad \quad \quad f$

を形成させ、洗浄する。

7.  $m$  を用いて、6. の結合体を定量する。

タイプ I は、目的の特異的糖鎖を有する共存物質がレクチン固相に結合することによる、レクチン固相の目的物質結合能力の低下を解消できるため、特異性に優れ、高感度になる利点を有する。

タイプ II、III は、目的の特異的糖鎖を有する共存物質が、抗体固相に非特異的に結合することによるバックグラウンドの増加を解消するため、特異性に優れ、高感度になる利点を有する。

タイプ IV、V は、大量に使用したレクチンが抗体固相に非特異的に結合することによるバックグ

ラウンドの増加を解消するため、特異性に優れ、高感度になる利点を有する。

#### 【実施例】

以下、本発明を実施例に即して説明するが、もとより、これに限られるものではない。

#### 実施例 1

#### 1. アフィニティー精製ジニトロフェニル-ヤギ抗ヒトアルファフェトプロテイン (hAFP) IgG の調製

##### (1) メルカプトサクシニル-ヤギ抗 hAPPIgG の調製

ヤギ抗 hAPPIgG に S-アセチルメルカプトサクシニック・アンハイドライド (ナカライテスク、京都) を用いて、公知の方法 [石川ら、ジャーナル・オブ・イムノアッセイ (J. Immunology, 4, 209 (1983))] に従って、チオール基を導入した。導入されたチオール基の数は、ヤギ抗 hAPPIgG 1 分子あたり、9.7 個であった。

##### (2) マレイミド-ジニトロフェニル-レーリジ

#### ンの調製

5.5mM ジニトロフェニル-レーリジン塩酸塩 (東京化成、東京) を含む 0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0、2.0 ml) と 5.5mM N-サクシニミジル-6-マレイミドヘキサノエートを含む N,N-ジメチルホルムアミド 0.2 ml とを 30℃、30 分反応させた。

##### (3) ジニトロフェニル-ヤギ抗 hAPPIgG の調製

(2) で調製したマレイミド-ジニトロフェニル-レーリジン 1.21 ml と、(1) で調製したメルカプトサクシニル-ヤギ抗 hAPPIgG 5.0 mg を溶解した 5 mM EDTA を含む 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.0、5.2 ml) とを 30℃、30 分反応させた。反応後、セファデックス G-25 (ファルマシア社、スウェーデン) によりゲル濾過を行い、ジニトロフェニル-ヤギ抗 hAPPIgG を得た。カラムサイズは、1.0 × 30cm、溶出液は 5 mM EDTA を含む 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.0) を用いた。

導入されたジニトロフェニル基の数は、メ

ルカプトサクシニルーヤギ抗hAPPIgG 1分子あたり4.2個であった。ジニトロフェニル基の数は、360nmでの吸光度から、モル吸光係数 $17400\text{mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$ として求めた。

#### (4) アフィニティー精製ジニトロフェニルーヤギ抗hAPPIgGの調製

ジニトロフェニルーヤギ抗hAPPIgGはhAPP不溶化セファローズ4Bカラムを用いpH2.5の塩酸で溶出する公知の方法〔河野ら、ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.), 100, 1247 (1986)〕によりアフィニティー精製した。

### 2. レンチルレクチン結合性hAPPの精製

原発性肝細胞癌患者血清0.5mlを0.1M酢酸ナトリウム緩衝液(pH7.0、0.5M NaCl、1mM  $\text{MgCl}_2$ 、1mM  $\text{CaCl}_2$ 、1mM  $\text{MnCl}_2$ )で平衡化したレンチルレクチンセファローズ4Bカラム(ファルマシア)、カラムサイズ $1.0 \times 20\text{cm}$ に流し、約60mlの同一緩衝液でカラムを洗浄した。1Mグルコースを含む同一緩衝液でレンチルレ

グ)〕表面上に公知の方法〔石川ら、スカンジナビアン・ジャーナル・オブ・イムノロジー (Scand. J. Immunol., 8(Suppl. 7), 43, 1978)〕で、物理的吸着によりIgGを吸着させ、アフィニティー精製ウサギ抗(ジニトロフェニルーウシ血清アルブミン)IgG不溶化固相を調製した。

### 4. レンチルレクチン不溶化固相の調製

レンチルレクチン溶液(0.1g/l)を用いて、ポリスチレンボール〔直径3.2mm(プレシジョン・プラスチックボール社、シカゴ)〕表面上に公知の方法〔石川ら、スカンジナビアン・ジャーナル・オブ・イムノロジー、前出〕で、レンチルレクチンを物理的に吸着させ、レンチルレクチン不溶化固相を調製した。

### 5. アフィニティー精製抗hAPPF(ab')<sub>2</sub>-β-D-ガラクトシダーゼの調製

#### (1) アフィニティー精製ヤギ抗hAPPF(ab')<sub>2</sub>の調製

ヤギ抗hAPPIgGは、ペプシンを用いる公知の

クチンカラムに吸着したhAPPを溶出させ、レンチルレクチン結合性hAPPを精製した。

レンチルレクチン結合性hAPPは、限外濾過により濃縮および緩衝液交換を行い、10mMトリス緩衝液(pH7.0、0.1%BSA、1mM  $\text{CaCl}_2$ 、1mM  $\text{MgCl}_2$ 、1mM  $\text{MnCl}_2$ 、0.005%チメロサル)溶液に溶解した。

### 3. アフィニティー精製ウサギ抗(ジニトロフェニルーウシ血清アルブミン)IgG不溶化固相の調製

ウサギ抗(ジニトロフェニルーウシ血清アルブミン)IgGはジニトロフェニルーウシ血清アルブミン不溶化セファローズ4Bカラムを用いpH2.5の塩酸で溶出する公知の方法〔河野ら、ジャーナル・オブ・バイオケミストリー、前出〕によりアフィニティー精製した。

アフィニティー精製ウサギ抗(ジニトロフェニルーウシ血清アルブミン)IgG溶液(0.1g/l)を用いてポリスチレンボール〔直径3.2mm(プレシジョン・プラスチックボール社、シカ

ゴ)〕表面上に公知の方法〔石川ら、ジャーナル・オブ・イムノロジー、前出〕により消化してF(ab')<sub>2</sub>を調製した後、hAPP不溶化セファローズ4Bカラムを用い、pH2.5の塩酸で溶出する公知の方法〔河野ら、ジャーナル・オブ・バイオケミストリー、前出〕によりアフィニティー精製し、アフィニティー精製ヤギ抗hAPPF(ab')<sub>2</sub>を調製した。

#### (2) アフィニティー精製抗hAPPF(ab')<sub>2</sub>-β-D-ガラクトシダーゼの調製

アフィニティー精製ヤギ抗hAPPF(ab')<sub>2</sub>にN, N'-o-フェニレンジマレイミドを、架橋剤として公知の方法〔石川ら、スカンジナビアン・ジャーナル・オブ・イムノロジー、前出〕によりガラクトシダーゼを標識した。

β-D-ガラクトシダーゼ1分子にF(ab')<sub>2</sub>が1.7個結合した。

アフィニティー精製ヤギ抗hAPPF(ab')<sub>2</sub>-β-D-ガラクトシダーゼは、レンチルレクチンセファローズ4Bカラム(ファルマシア)、



カラムサイズ1.0 × 7 cmを通過させた。

## 6. ジニトロフェニル-非特異ウサギFab' の調製

### (1) メルカプトサクシニル-非特異ウサギFab' の調製

非特異ウサギIgG は、ペプシンを用いる公知の方法〔石川ら、ジャーナル・オブ・イムノアッセイ、前出〕により消化し、非特異ウサギF(ab')<sub>2</sub>を調製した。非特異ウサギF(ab')<sub>2</sub>にS-アセチルメルカプトスクシニク・アンハイドライド（ナカライテスク、京都）を用いて、公知の方法〔石川ら、ジャーナル・オブ・イムノアッセイ、前出〕に従ってS-アセチルメルカプト基を導入した。ヒドロキシルアミンおよびメルカプトエチルアミンを用いてチオール基が導入された非特異ウサギFab' を得た。導入されたチオール基の数は、非特異ウサギFab' 1分子あたり、5.6個であった。

### (2) マレイミド-ジニトロフェニル-ラーリジ

cm、溶出液は10mMトリス緩衝液(pH7.0、0.1 M NaCl、1 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM CaCl<sub>2</sub>、1 mM MnCl<sub>2</sub>、0.1% BSA、0.1 % NaH<sub>2</sub>)を用いた。

導入されたジニトロフェニル基の数は、メルカプトサクシニル-非特異ウサギFab' 1分子あたり3.7個であった。

## 7. β-D-ガラクトシダーゼの活性測定

β-D-ガラクトシダーゼ活性は、4-メチルウンベリフェニル-β-D-ガラクトシドを基質として、30℃、30分の反応後、公知の方法で蛍光光学的に測定した〔今川ら、アナリティカル・クリニカル・バイオケミストリー (Anal. Clin. Biochem., 20, 310 (1984))〕。蛍光強度は、10<sup>-7</sup>M 4-メチルウンベリフェロンを溶解した0.1 Mグリシン-NaOH緩衝液、pH10.3を標準として測定した。

## 8. レンチルレクチン結合性hAFPの定量

アフィニティー精製ジニトロフェニル-ヤギ抗hAFP IgG 100fmol およびhAFPおよび血清を含

ンの調製

100mM ジニトロフェニル-ラーリジン塩酸塩（東京化成、東京）を含むN, N-ジメチルホルムアミド 2.0mlと5 mM EDTAを含む0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0、6 ml)とを混合後、55mM N-サクシニミジル-6-マレイミドヘキサノエートを含むN, N-ジメチルホルムアミド 0.8mlとを30℃、30分反応させた。

### (3) ジニトロフェニル-非特異ウサギFab' の調製

(2)で調製したマレイミド-ジニトロフェニル-ラーリジン 8.8mlと、(1)で調製したメルカプトサクシニル-非特異ウサギFab' 60mgを溶解した5 mM EDTAを含む0.1 Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.0、5.6ml)とを30℃、30分反応させた。反応後、ウルトロゲルAcA 44 (LKB、スウェーデン)により、ゲル濾過を行い、ジニトロフェニル-非特異ウサギFab' を得た。カラムサイズは1.5 × 45

μ試料を10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0、0.4 M NaCl、0.1 % BSA、0.1 % NaH<sub>2</sub>)に溶解後、20℃で3時間反応させた。

アフィニティー精製ウサギ抗（ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン）IgG 不溶化固相を2個入れ、さらに、20℃で3時間反応させた。

氷冷した10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0、0.1 M NaCl、0.1 % BSA、0.1 % NaH<sub>2</sub> (緩衝液A)) 2mlにて2回固相を洗浄した後、10mMトリス緩衝液(pH7.0、0.1 M NaCl、1 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM CaCl<sub>2</sub>、1 mM MnCl<sub>2</sub>、0.1 % BSA、0.1 % NaH<sub>2</sub> (緩衝液B))に溶解した1 mMジニトロフェニル-ラーリジン溶液 130μlを加え、20℃で1時間反応させた。アフィニティー精製ウサギ抗（ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン）IgG 不溶化固相を取り除き、反応溶液を4℃で一晩静置した。

緩衝液Bに溶解した75μgのジニトロフェニル-非特異ウサギFab' 20μlを加え、さらに、レンチルレクチン不溶化固相を2個加え、20℃

で3時間反応させた。

氷冷した緩衝液B 2 mlにて2回固相を洗浄した後、アフィニティー精製ヤギ抗hAPP Fab' -  $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ10fmolを溶解した緩衝液B 150  $\mu$ lを加え、20℃で3時間反応させた。

氷冷した緩衝液B 2 mlにて2回固相を洗浄した後、固相に結合した $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ活性を30℃で150分測定した。

測定結果は第1図に示した。

#### 比較例1

レンチルレクチン不溶化固相の調製、アフィニティー精製ヤギ抗hAPP Fab' -  $\beta$ -D-ガラクトシダーゼの精製は実施例1に従った。

#### 1. レンチルレクチン結合性hAPPの定量

hAPPおよび血清を含む試料を10 mMトリス緩衝液(pH7.0、0.4 M NaCl、1 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM CaCl<sub>2</sub>、1 mM MnCl<sub>2</sub>、0.1% BSA、0.1% NaN<sub>3</sub>)に溶解後、レンチルレクチン不溶化固相2個を加え、20℃で3時間、4℃で一夜反応させ

た。

氷冷した10mMトリス緩衝液(pH7.0、0.1 M NaCl、1 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM CaCl<sub>2</sub>、1 mM MnCl<sub>2</sub>、0.1% BSA、0.1% NaN<sub>3</sub> (緩衝液B)) 2 mlにて2回固相を洗浄した後、アフィニティー精製ヤギ抗hAPP Fab' -  $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ10fmolを溶解した緩衝液B 150  $\mu$ lを加え、20℃で3時間反応させた。

氷冷した緩衝液B 2 mlにて2回固相を洗浄した後、固相に結合した $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ活性を30℃で30分測定した。

第1図に示したように、本発明による実施例1では、血清存在下、また血清非存在下、いずれの場合においても同様に、高感度(3 fmol/tube)でhAPPを定量できた。しかし、従来法である比較例1では、血清存在下では、顕著な感度の低下が生じた。

#### 実施例2

アフィニティー精製ジニトロフェニル-ヤギ抗hAPP IgGの調製、アフィニティー精製ウサギ抗

(ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG不溶化固相の調製、レンチルレクチン結合性hAPPの精製は実施例1に従った。

#### 1. レンチルレクチン- $\beta$ -D-ガラクトシダーゼの調製

##### (1) メルカプトサクシニル-レンチルレクチンの調製

レンチルレクチンに、S-アセチルメルカプトスクシニック・アンハイドライド(ナカライテスク、京都)を用いて、公知の方法〔石川ら、ジャーナル・オブ・イムノアッセイ、前出〕に従って、チオール基を導入した。導入されたチオール基の数は、レンチルレクチン1分子あたり、0.7個であった。

##### (2) マレイミド- $\beta$ -D-ガラクトシダーゼの調製

$\beta$ -D-ガラクトシダーゼに、N, N'-o-フェニレンジマレイミドを用いて公知の方法〔石川ら、スカンジナビアン・ジャーナル・オブ・イムノロジー、前出〕で、マレイ

ミド基を導入した。 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ1分子あたり12個のマレイミド基が導入された。

##### (3) レンチルレクチン- $\beta$ -D-ガラクトシダーゼの調製

(1)で調製したメルカプトサクシニル-レンチルレクチン0.67mgを含む0.1 Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.0、15ml)と、(2)で調製したマレイミド- $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ1.07mgを溶解した0.1 Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.0、1.26ml)とを混合後、限外濾過で1 mlにまで濃縮し、4℃で一夜反応させた。反応後、セファローズCL-6Bカラムによりゲル濾過を行い、レンチルレクチン- $\beta$ -D-ガラクトシダーゼを得た。カラムサイズは1.5 × 65cm、溶出液は0.01% BSAを含む10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0、0.1 M NaCl、1 mM MgCl<sub>2</sub>、0.1% NaN<sub>3</sub>)を用いた。導入されたレンチルレクチンの数は $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ1分子あたり2.7個であっ

た。

## 2. アフィニティー精製ウサギ抗(ヤギIgG)F(ab')<sub>2</sub>不溶固相の調製

ウサギ抗(ヤギIgG)IgGから実施例1の1と同様の方法で、ペプシン消化を行い、正常ヤギIgG不溶化セファローズ4Bカラムを用いアフィニティー精製ウサギ抗(ヤギIgG)F(ab')<sub>2</sub>を得た。実施例1の3.と同様の方法でポリステレンボール上にアフィニティー精製ウサギ抗(ヤギIgG)F(ab')<sub>2</sub>を物理的に吸着させ、アフィニティー精製ウサギ抗(ヤギIgG)F(ab')<sub>2</sub>不溶化固相を得た。

## 3. レンチルレクチン結合性hAPPの定量

アフィニティー精製ジニトロフェニル-ヤギ抗hAPP IgG 100fmol およびhAPPおよび血清を含む試料を10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0、0.4 M NaCl、0.1 % BSA、0.1 % NaN<sub>3</sub>)に溶解後、20℃で3時間反応させた。

アフィニティー精製ウサギ抗(ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン)IgG不溶化固相を

2個入れ、さらに、20℃で3時間、4℃で一夜反応させた。

氷冷した10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0、0.1 M NaCl、0.1 % BSA、0.1 % NaN<sub>3</sub>(緩衝液A))2mlにて2回固相を洗浄した後、10mMトリス緩衝液(pH7.0、0.1 M NaCl、1 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM CaCl<sub>2</sub>、1 mM MnCl<sub>2</sub>、0.1 % BSA、0.1 % NaN<sub>3</sub>(緩衝液B))に溶解したレンチルレクチン-β-D-ガラクトシダーゼ1 pmolを加え、20℃で3時間反応させた。

氷冷した緩衝液B 2mlにて2回固相を洗浄した後、緩衝液Bに溶解した1 mMジニトロフェニル-リジン溶液150 μlを加え、20℃で1時間反応させた。アフィニティー精製ウサギ抗(ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン)IgG不溶化固相を取り除き、アフィニティー精製ウサギ抗(ヤギIgG)F(ab')<sub>2</sub>不溶化固相を2個入れ、20℃で3時間反応させた。氷冷した緩衝液B 2mlにて2回固相を洗浄した後、固相に結合したβ-D-ガラクトシダーゼ活性を測定した。

測定結果は第2図に示した。

### 比較例2

レンチルレクチン-β-D-ガラクトシダーゼの調製は実施例2に従った。

## 1. ヤギ抗hAPP F(ab')<sub>2</sub>不溶化固相の調製

ヤギ抗hAPP IgGはペプシンを用いる公知の方法〔石川ら、ジャーナル・オブ・イムノアッセイ、前出〕により消化しF(ab')<sub>2</sub>を調製した。ヤギ抗hAPP F(ab')<sub>2</sub>溶液(0.1g/2)を用いてポリステレンボール(直径3.2 mm)表面上に公知の方法〔石川ら、スカンジナビアン・ジャーナル・オブ・イムノロジー、前出〕に物理的に吸着させ、ヤギ抗hAPP F(ab')<sub>2</sub>不溶化固相を調製した。

## 2. レンチルレクチン結合性hAPPの定量

hAPPおよび血清を含む試料を10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0、0.4 M NaCl、0.1 % BSA、0.1 % NaN<sub>3</sub>)に溶解後ヤギ抗hAPP F(ab')<sub>2</sub>不溶化固相を2個入れ、20℃で3時間、4℃で一夜反応させた。氷冷した10mMリン酸ナトリウ

ム緩衝液(pH7.0、0.1 M NaCl、0.1 % BSA、0.1 % NaN<sub>3</sub>(緩衝液A))2mlにて2回固相を洗浄した後、10mMトリス緩衝液(pH7.0、0.1 M NaCl、1 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM CaCl<sub>2</sub>、1 mM MnCl<sub>2</sub>、0.1 % BSA、0.1 % NaN<sub>3</sub>(緩衝液B))に溶解したレンチルレクチン-β-D-ガラクトシダーゼ100fmolを加え、20℃で3時間反応させた。

氷冷した緩衝液B 2mlにて2回固相を洗浄した後、固相に結合したβ-D-ガラクトシダーゼ活性を測定した。

第2図に示すように、本発明の実施例1では、血清共存下においても、hAPPを高感度(1~3 fmol/tube)で定量できた。しかし、従来法である比較例2では、著しいバックグラウンド蛍光(約100倍)が認められ、感度も約1/10であった。

### 実施例3

アフィニティー精製ジニトロフェニル-ヤギ抗hAPP IgGの調製、アフィニティー精製ウサギ抗(ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン)IgG

不溶化固相の調製、レンチルレクチン結合性hAPPの精製は実施例1に、レンチルレクチン- $\beta$ -D-ガラクトシダーゼの調製、アフィニティー精製ウサギ抗(ヤギIgG) F(ab'), 不溶化固相の調製は実施例2に従った。

#### 1. アフィニティー精製ウサギ抗(ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) F(ab'), 不溶化固相の調製

ウサギ抗(ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG はペプシンを用いる公知の方法〔石川ら、ジャーナル・オブ・イムノアッセイ、前出〕により消化し F(ab')<sub>2</sub> を調製後、ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン不溶化セファロース 4 B カラムを用い、pH2.5 の塩酸で溶出する公知の方法〔河野ら、ジャーナル・オブ・バイオケミストリー、前出〕によりアフィニティー精製した。

アフィニティー精製ウサギ抗(ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) F(ab')<sub>2</sub> 溶液(0.1g/ℓ)を用いてポリスチレンボール〔直径3.

え、20℃で1時間反応させた。アフィニティー精製ウサギ抗(ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) F(ab')<sub>2</sub> 不溶化固相を取り除き、20μℓの緩衝液Bに溶解したレンチルレクチン- $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ 100fmolを加え、20℃で3時間反応させた。

アフィニティー精製ウサギ抗(ヤギIgG) F(ab')<sub>2</sub> 不溶化固相を入れ、20℃で3時間反応させた。

氷冷した緩衝液B 2mlにて2回固相を洗浄した後、固相に結合した $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ活性を測定した。

結果を第3図に示した。なお、アフィニティー精製ジニトロフェニル-ヤギ抗hAPP IgG 0 fmolの場合を対照とした。

#### 比較例 3

アフィニティー精製ジニトロフェニル-ヤギ抗hAPP IgG の調製、アフィニティー精製ウサギ抗(ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) F(ab')<sub>2</sub> 不溶化固相の調製、レンチルレクチン- $\beta$ -

2 mm (プレシジョン・プラスチックボール社、シカゴ) 表面上に公知の方法〔石川ら、スキャンジナビアン・ジャーナル・オブ・イムノロジー、前出〕で、物理的吸着によりアフィニティー精製ウサギ抗(ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) F(ab')<sub>2</sub> 不溶化固相を調製した。

#### 2. レンチルレクチン結合性hAPPの定量

アフィニティー精製ジニトロフェニル-ヤギ抗hAPP IgG 100fmol およびhAPPを含む試料を10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0、0.1 M NaCl、1 mM MgCl<sub>2</sub>、0.1 % BSA、0.1 % NaN<sub>3</sub>(緩衝液A))に溶解後、20℃で3時間反応させた。アフィニティー精製ウサギ抗(ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) F(ab')<sub>2</sub> 不溶化固相を2個入れ、さらに、20℃で一晩反応させた。

氷冷した緩衝液A 2mlにて2回固相を洗浄した後、10mMトリス緩衝液(pH7.0、0.1 M NaCl、1 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM CaCl<sub>2</sub>、1 mM MnCl<sub>2</sub>、0.1 % BSA、0.1 % NaN<sub>3</sub>(緩衝液B))に溶解した1 mMジニトロフェニル-リジン溶液130 μℓを加

D-ガラクトシダーゼの調製、レンチルレクチン結合性hAPPの精製は実施例3に従った。

#### 1. レンチルレクチン結合性hAPPの定量

アフィニティー精製ジニトロフェニル-ヤギ抗hAPP IgG 100fmol およびhAPPを含む試料を10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0、0.1 M NaCl、1 mM MgCl<sub>2</sub>、0.1 % BSA、0.1 % NaN<sub>3</sub>(緩衝液A))に溶解後、20℃で3時間反応させた。アフィニティー精製ウサギ抗(ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) F(ab')<sub>2</sub> 不溶化固相を2個入れ、20℃、3時間反応後、さらに、4℃で一晩反応させた。

氷冷した緩衝液A、2mlにて2回固相を洗浄した後、レンチルレクチン- $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ 100fmolを、10mMトリス緩衝液(pH7.0、0.1 M NaCl、1 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM CaCl<sub>2</sub>、1 mM MnCl<sub>2</sub>、0.1 % BSA、0.1 % NaN<sub>3</sub>(緩衝液B))に溶解した溶液 150 μℓを加え、20℃で3時間反応させた。

氷冷した緩衝液B 2mlにて2回固相を洗浄し

た後、固相に結合した $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ活性を測定した。

結果を第3図に示した。なお、アフィニティー精製ジニトロフェニル-ウサギ抗hAPPIgG 0 fmolの場合を対照とした。従来法による比較例3では、hAPPの蛋白質部位を認識する抗体を系に加えない対照群においても、hAPPの増加につれて測定値が増加している。これはレクチン-糖鎖、および抗原-抗体の結合を利用して、測定対象を定量するというサンドイッチ法の原理からすると説明できず、特異性、定量性を疑わせるものである。

これに対して、実施例3は、本発明によりレクチンと特異的抗体で認識されたhAPPのみを測定しうることを明確に示すものである。

#### 実施例4

レンチルレクチン結合性hAPPの精製、アフィニティー精製ウサギ抗(ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG 不溶化固相の調製は実施例1に従った。

ギ抗hAPPIgG 100fmol およびhAPPおよび血清を含む試料を10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0、0.4 M NaCl、0.1 % BSA、0.1 % NaN<sub>3</sub>)に溶解後、20℃で3時間反応させた。

アフィニティー精製ウサギ抗(ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG 不溶化固相を2個入れ、20℃で3時間、さらに4℃で一夜反応させた。

氷冷した10mMトリス緩衝液(pH7.0、0.1 M NaCl、1 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM CaCl<sub>2</sub>、1 mM MnCl<sub>2</sub>、0.1 % BSA (緩衝液A)) 2mlにて2回固相を洗浄した後、緩衝液Aに溶解した6.67 $\mu$ M LCA溶液 150 $\mu$ lを加え、室温で1夜反応させた。氷冷した緩衝液A 2mlにて2回固相を洗浄した後、ウサギ抗LCAPab' - $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ 10fmol を溶解した緩衝液A 150 $\mu$ lを加え、20℃で3時間反応させた。氷冷した緩衝液A 2mlにて2回固相を洗浄した後、緩衝液Aに溶解した1mMジニトロフェニル-リジン溶液 150 $\mu$ lを加え、20℃で1時間反応させた。

アフィニティー精製ジニトロフェニル-ウサギ抗hAPPIgGの調製は実施例1に準じて、また、アフィニティー精製ヤギ抗(ウサギIgG) F(ab')<sub>2</sub>、不溶化固相の調製は実施例2に準じて実施した。

#### 1. ウサギ抗レンチルレクチン(LCA) F(ab')<sub>2</sub> - $\beta$ -D-ガラクトシダーゼの調製

##### (1) ウサギ抗LCAP(ab')<sub>2</sub>の調製

ウサギ抗LCA IgG はペプシンを用いる公知の方法〔石川ら、ジャーナル・オブ・イムノアッセイ、前出〕により消化しF(ab')<sub>2</sub>を調製した。

##### (2) ウサギ抗LCAPab' - $\beta$ -D-ガラクトシダーゼの調製

ウサギ抗LCAP(ab')<sub>2</sub>は、N, N'-o-フェニレンジマレイミドを架橋剤として公知の方法〔石川ら、スキャンジナビアン・ジャーナル・オブ・イムノロジー、前出〕によりガラクトシダーゼを標識した。

#### 2. レンチルレクチン結合性hAPPの定量

アフィニティー精製ジニトロフェニル-ウサ

ギ抗(ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG 不溶化固相を取り除き、アフィニティー精製ヤギ抗(ウサギIgG) F(ab')<sub>2</sub>、不溶化固相を2個加え、20℃で3時間反応させた。

氷冷した緩衝液A 2mlにて2回固相を洗浄した後、固相に結合した $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ活性を測定した。測定結果は、第4図に示した。

#### 比較例4

アフィニティー精製ジニトロフェニル-ウサギ抗hAPPIgGの調製、レンチルレクチン結合性hAPPの精製、アフィニティー精製ウサギ抗(ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG 不溶化固相の調製、抗LCAPab' - $\beta$ -D-ガラクトシダーゼの調製は実施例4に従った。

#### 1. レンチルレクチン結合性hAPPの定量

アフィニティー精製ジニトロフェニル-ウサギ抗hAPPIgG 100fmol およびhAPPおよび血清を含む試料を10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0、

0.4 M NaCl、0.1 % BSA、0.1 % NaN<sub>3</sub>)に溶解後、20℃で3時間反応させた。

アフィニティー精製ウサギ抗 (ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG 不溶化固相を2個入れ、20℃で3時間、さらに、4℃で一夜反応させた。

氷冷した10mMトリス緩衝液 (pH7.0、0.1 M NaCl、1 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM CaCl<sub>2</sub>、1 mM MnCl<sub>2</sub>、0.1% BSA (緩衝液A)) 2 mlにて2回固相を洗浄した後、緩衝液Aに溶解した6.67 μM LCA溶液 150 μlを加え、室温で1夜反応させた。氷冷した緩衝液A 2 mlにて2回固相を洗浄した後、ウサギ抗LCA Fab' -β-D-ガラクトシダーゼ 10 fmolを溶解した緩衝液A 150 μlを加え、20℃で3時間反応させた。氷冷した緩衝液A 2 mlにて2回固相を洗浄した後、固相に結合したβ-D-ガラクトシダーゼ活性を測定した。測定結果は第4図に示した。

第4図に示したように、本発明による実施例4では10 fmol / tubeのhAFPが定量できた。しか

し、比較例4ではバックグラウンドの増加が著しく、100 fmol / tubeのhAFP定量が可能であった。

#### 【効果】

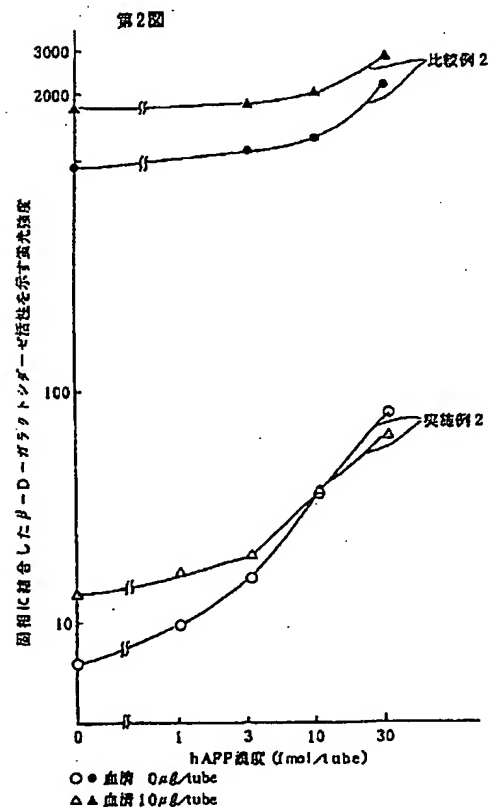
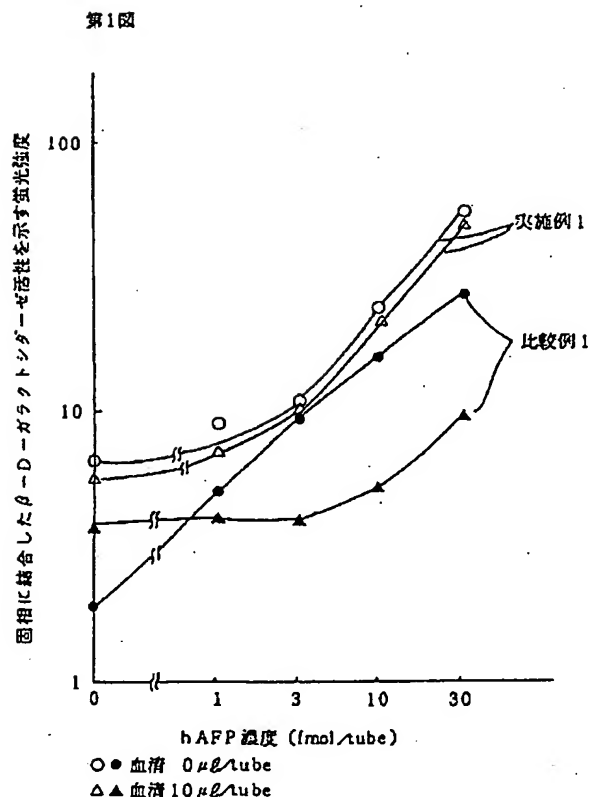
以上のように、本発明は従来のレクチンを用いた糖鎖を有する生体内微量物質の測定法に無い、高感度、特異的かつ迅速な定量法を提供するものであり、臨床検査薬の発展に寄与するものである。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図、第2図、第3図及び第4図はそれぞれ、本発明による実施例1、2、3及び4と従来法による比較例1、2、3および4の実験結果を示している。横軸は、測定対象であるhAFPの添加量、縦軸は、検出された標識 (β-D-ガラクトシダーゼ) の量を表す蛍光強度である。

特許出願人 石川栄治 (ほか1名)

代理人 弁理士 細田芳徳 (ほか1名)



第4図

